

⑯ 公開特許公報 (A) 平3-48700

⑮ Int. Cl.⁵

C 07 K 15/14
 G 01 N 33/53
 // A 61 K 33/564
 C 12 P 39/395
 C 12 P 21/02

識別記号

府内整理番号

⑯ 公開 平成3年(1991)3月1日

N 8619-4H
 B 7906-2G
 W 7906-2G
 A 8829-4C
 A 8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑯ 発明の名称 アガラクトシル IgG および診断薬

⑯ 特願 平1-182168

⑯ 出願 平1(1989)7月14日

⑯ 発明者 水落 次男 愛知県名古屋市昭和区滝川町26-1-B-110

⑯ 発明者 千谷 晃一 愛知県春日井市岩成台8丁目3番地6

⑯ 発明者 山田 雄二 滋賀県つくば市梅園2-16-1 ルンビーニ梅園503

⑯ 発明者 小出 酵 滋賀県つくば市大字小白畠672-223

⑯ 出願人 学校法人藤田学園 愛知県豊明市栄町南館12番地の1

⑯ 出願人 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号

⑯ 復代理人 弁理士 古谷 鑿

明細書

1. 発明の名称

アガラクトシル IgG および診断薬

2. 特許請求の範囲

1 ヒト IgG を β -ガラクトシダーゼによって

処理して得られ、下記の理化学的性状 (i)

～(vi) を有するアガラクトシル IgG 。

(i) 分子量 150～170KD (SDS-PAGE)

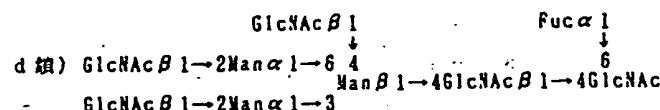
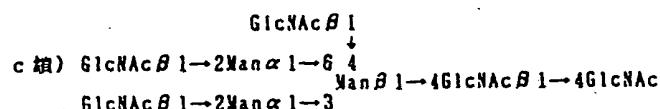
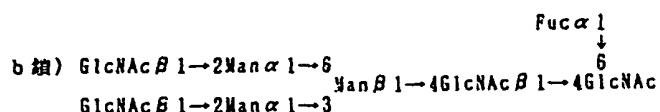
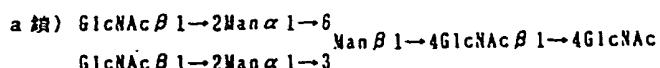
(ii) 抗ヒト IgG 抗体と反応する

(iii) プロテイン A またはプロテイン G と反応する

(iv) リシナスコミニスアグルチニン (RCA₁₂₀) と反応しない

(v) コンカナバリン A (Con A)、レンズカリナリスアグルチニン (LCA)、パンデータラシンブリシホリヤ II (BS II) との反応性がヒト IgG よりも大きい

(vi) 糖部分が次の a 頃～d 頃のみより構成される



2 請求項第1項記載のアガラクトシル IgG を使用することを特徴とするリウマチ診断薬。

3 アガラクトシル IgG がニトロセルロース膜に固定化されることを特徴とする請求項第2項記載のリウマチ診断薬。

3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明はアガラクトシルIgG およびこれを使用した診断薬に関する。更に詳しくは、 β -ガラクトシダーゼで処理して得られたヒトIgG であり、ガラクトースを含んでおらず、かつ所定の理化学的性状を示す物質およびそれを使用する診断薬に関する。

〔従来技術〕

慢性関節リウマチ患者（以下RA患者と略す）の血清中にはいわゆるリウマチ因子といわれる自己免疫抗体が存在し、これはヒト免疫グロブリンG（IgGと略す）のFc部位に存在する抗原を認識することが知られている（文献1）。ところで、最近、RA患者の血清中のIgG のFc部位に存在する糖鎖について詳細な分析が加えられ、その結果、該糖鎖は健常人の血清中のIgG のFc部位における糖鎖に比較してガラクトース含有量が著しく減少していることが本発明者的一部によって見出された（文献2, 3）。即ち、健常人血清中のIgG のFc部位における糖部分は互いに構造の異なる複数の種類の糖鎖から構成さ

れており、種類間の存在比率は個体間でほぼ一定であることが明らかにされた（文献4）。ところが、RA患者の血清中のIgG のFc部位における糖部分を調べてみると、構造の異なる複数の種類の糖鎖から構成されており、種類間の比率は健常人の場合と同様に個体間でほぼ一定となるが、全体にガラクトースの含有量が著しく減少していることが判明した。更に具体的に述べれば、健常人血清中のIgG のFc部位の糖部分にはガラクトースをそれぞれ2分子、1分子および0分子含む三種類の糖鎖が約2:2:1の比率で存在するが、RA患者血清中のIgG のFc部位の糖部分ではガラクトースを2分子含む種類の糖鎖が著しく減少し、全体にガラクトースを欠損した糖鎖が大幅に増加していることが判明したのである（文献2, 3）。この事実に基づけばRA患者血清中のIgG のFc部位の糖部分には糖鎖についての構造異常が起こっており、この構造異常を把握することが可能となれば、それはRAのマーカーとして使用することができるこ

が知られるのである（文献5）。

以下に列挙する文献1～5は以上の知見をより詳細に記述したものであり、本発明において参考される。

文献

- 1) Kunkel, H. G. and Tan, E. M. (1964) : Autoantibodies and disease. *Adv. Immunol.*, 4 : 351
- 2) 水落次男、谷口隆弘、長野吉伸、竹内二士夫、松多邦雄、宮本昭正、木幡陽「リウマチ患者におけるIgG-糖鎖の構造異常」第28回リウマチ学会総会（昭和59年5月24日）にて口頭発表<講演番号288>
- 3) Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., et al. (1985) : Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with change in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316, 452-457
- 4) Mizuochi, T., Taniguchi, T., Shimizu, A., Kobata, A. (1982) STRUCTURAL AND NUMERICAL

VARIATIONS OF THE CARBOHYDRATE MOIETY OF IMMUNOGLOBULIN G¹ : *J. Immunol.*, 129, 2016-2020

- 5) Mizuochi, T., (1985) : Reactant to rheumatoid factor : abnormality in the sugar chains of IgG in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol.*, 17, 977-984

さて、上記したところより明らかなるごとく血清中IgG のFc部位の糖部分におけるガラクトース欠損を把握する測定がRAの診断にあたり有用となることが知られるのであるが、この測定が容易となるためには該被測定対象物のモデル物質として、ガラクトースを欠損した糖鎖を持つIgG 、即ち、いわゆるアガラクトシルIgG が用意されることが望まれる。そのようなアガラクトシルIgG が用意されれば、例えばそのモノクロナール抗体を用意することができ、これを使用してRAの診断をより容易にかつ正確に行うことができるようになる。また該アガラクトシルIgG を使用して血清中のリウマチ因子を直接

に測定することにより、RAを診断することができる。

しかし、このようなアガラクトシルIgGはヒトIgGをどのような酵素によって処理して得られ、かつどのような理化学的性状を有するものであるべきかについては未だ知られていない。

[解決手段]

本発明者らは種々の検討の結果、ヒトIgGを β -ガラクトシダーゼによって処理することにより得られ、所定の理化学的性状を有する新規なアガラクトシルIgGを得ることに成功し、更に該物質の診断上の有用性を確認して本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明アガラクトシルIgGはヒトIgGを β -ガラクトシダーゼによって処理することによって得られる。ヒトIgGは例えばシグマ社より提供される粉末IgGを入手して使用すればよい。

β -ガラクトシダーゼによる処理は酵素処理のための通常の方法によって行えばよいが、後記

実施例において示されるごとくなるべく複数な条件で行うのがよく、急激な反応となることを避けるようにした方がよい。また、 β -ガラクトシダーゼ処理を行うに先立って予めシアリダーゼ処理などの脱シリアル化処理を行うのが望ましいが、本発明はそれらの前処理によって限定されない。ガラクトシダーゼ処理後は適当な精製方法、例えばプロテインAセファロースを使用するアフィニティーコロマトによって精製すればよい。

本発明アガラクトシルIgGは下記の理化学的性状 (i) ~ (vi) によって特徴づけられる。

(i) 分子量150~170KD (SDS-PAGE)

(ii) 抗ヒトIgG 抗体と反応する

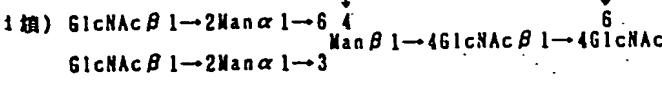
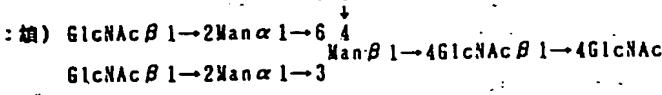
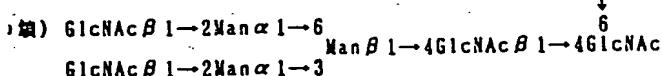
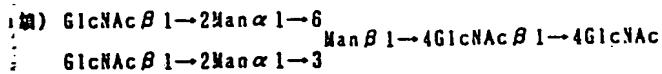
(iii) プロテインAまたはプロテインGと反応する

(iv) リシナスコミニスアグルチニン (RCA₁₂₀) と反応しない

(v) コンカナバリンA (Con A), レンズカリナリスアグルチニン (LCA), バンデーラシ

ンブリシホリヤII (BSII) との反応性がヒトIgGよりも大きい

(vi) 糖部分が次のa館~d館のみより構成される



オクタロニー法により確認すればよい。プロテインAまたはプロテインGとの反応性はそれぞれ市販のものに試料をミックスし、放置後に複合体が形成して沈殿が生ずるか否かを観察すればよい。リシナスコミニスアグルチニン (RCA₁₂₀) との反応性は、まず試料をニトロセルロース膜にドットプロットし、ここに標識RCA₁₂₀、例えばバーオキシダーゼRCA₁₂₀を加え、更に常法によりバーオキシダーゼ基質を加えて発色の有無を観察すればよい。Con A, LCA, BSIIとの反応性の大きさを観察するためには、まず試料およびヒトIgGをそれぞれニトロセルロース膜にドットプロットし、ここに例えばバーオキシダーゼあるいはビオチンで標識した標識Con A、標識LCA、標識BSIIを加え、それぞれ常法により発色させ、試料における発色の度合とヒトIgGにおける発色の度合とを比較すればよい。

構成糖鎖の分析は水落らの方法に従って行えばよい。即ち、試料からヒドロジン分解法(文献6, 文献7)によりアスパラギン結合糖鎖を

SDS-PAGEによる分子量測定は常法によって行えばよい。抗ヒトIgG 抗体との反応性は例えばシグマ社のマウス抗ヒトIgG 抗体を使用して

定量的に並離し、これを、N-アセチル化後、 NaBH_4 で還元してトリチウム標識少糖画分を得、次にこの画分をpH5.4の高圧逆紙電気泳動で分画し、各画分を直接シリカゲル消化し、得られた中性少糖混合物をBio-Gel P-4カラムを用いた液体クロマトグラフィーにかけて分子サイズによる分画を行い、各画分についてその糖鎖構造の帰属をエキソグリコシダーゼを用いて決定する。

文献

6) Takasaki, S., Mizuuchi, T. & Kobata, A. : Hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides. *Methods Enzymol.*, 83 : 263, 1982.

7) 水落次男, 木幡 陽: マーカーの各種測定法と関連技術の開発—糖蛋白質の糖鎖構造とその癌性変化、最新医学, 36 : 901, 1981.
本発明アガラクトシルIgGについて上記構成糖鎖の分析を行うと前記a鎖～d鎖のみが検出される。この事実より本発明アガラクトシルIgG

は全くガラトースを含有しないことが知られる。また構成糖鎖の存在比率を求めてみるとa鎖、b鎖、c鎖、d鎖はそれぞれ例えば約1:20:1:4の比率となる。しかしこの比率によって本発明は限定されない。

本発明診断薬は、本発明アガラクトシルIgGを使用するリウマチ診断薬であり、従って本発明アガラクトシルIgGの用途発明である。アガラクトシルIgGは血清中のリウマチ因子と結合するのでリウマチの診断に使用することができる。

本発明診断薬を使用して診断を行う方法は例えば基本的には以下のように行えばよい。まずニトロセルロース膜に本発明アガラクトシルIgGを固定し、ここに試料血清を加えて反応させ、次にバーオキシダーゼRCA₁₂₀を加え、洗浄後バーオキシダーゼの基質液を発色させ測定する。この方法において本発明診断薬はアガラクトシルIgGを必須の要素として提供しており、測定操作の過程で使用されるその他の成分、例えば

磷酸緩衝液、ブロッキング液、ニトロセルロース膜、バーオキシダーゼRCA₁₂₀、トリス緩衝液、基質溶液、反応停止液等は測定者の便益のため診断薬のセットの中に適宜に加えればよく、これらの添加によって本発明は限定されない。

後記実験例によって示されるごとく本発明診断薬を使用してリウマチの診断テストを行ったところ、健常人血清とリウマチ患者血清との間には明瞭な差が観察された。従って、本発明診断薬により、従来から診断が困難とされたリウマチを簡便かつ正確に診断することができることがわかった。即ち、リウマチ患者血清中にはリウマチ因子が存在するので、これはニトロセルロース膜に固定化された本発明アガラクトシルIgGにドップされ、次に標識レクチン、例えばバーオキシダーゼRCA₁₂₀と定量的に反応し、呈色するに至る。反対に健常人血清には十分な量のリウマチ因子が存在しないので、バーオキシダーゼRCA₁₂₀はアガラクトシルIgGと反応せず、洗浄により除去され、その結果、基質を加

えても呈色しない。

[実施例]

以下実施例によって本発明を更に具体的に説明する。

実施例1

1. アガラクトシルIgGの調整法

ヒトIgGタンパク10mg/mlを0.1M酢酸バッファー(pH5.0)中でシリカゲル処理(500mU/ml)した後、0.1Mクエン酸-リン酸バッファー(pH7.0)を加え、β-ガラクトシダーゼで処理する。これらの酵素処理後試料溶液中の10倍量のグリシンバッファー(1.5M Glycine-HCl, 3M NaCl, pH8.9; 結合バッファー)を加え、酵素処理溶液中に含まれているBSAあるいはシリカゲル、β-ガラクトシダーゼ等を除去するために、protein A-Sepharose CL-4Bを用いて酵素処理溶液中からアガラクトシルIgGを精製した。即ち、予め結合バッファーで平衡化しておいたprotein A-Sepharose CL-4B(1×7.8cm)に酵素処理試料

を添加した後、十分にカラムを結合バッファーで洗浄した後、0.1Mグリシン-HCl (pH3)により本発明試料を回収した。なお、回収の際には、本発明試料をpH3.0の状態に長時間放置するのを回避するために分画容量と同量の結合バッファーをチューブに入れておいた。

回収後、本発明試料はリン酸バッファー (10mMリン酸塩、0.15MNaCl, pH7.2) に十分透析した。

2. 調整したAgalactosyl IgG を適当な固相体 (例えばニトロセルロース膜やカップなど) に結合させる。即ち、Agalactosyl IgG (250 μ g/ml) を50mMリン酸バッファー (0.15MNaCl, pH7.4) に溶かし、その20 μ gをニトロセルロース膜にドットプロッティングを行い、30分間吸引乾燥を行う。乾燥後、プロッキングバッファー (50mM Tris-HCl, 0.15MNaCl, 0.05% NP-40, 2.5%ゼラチン (w/v), pH7.4) でプロッキングを行い、本発明診断薬とする。

実施例 2

- (3) 調整した試料250 μ g/mlとマウス抗ヒトIgG 抗体を用いて、常法によるオクタロニー免疫二重拡散法にて24時間室温にて反応させた。
- (4) 本発明試料がプロテインAとの反応性が保持されているかを検討するために、調整した試料溶液 (1mg/ml) にプロテインA (1mg/ml) 溶液を10:1の割合で混合し、室温にて放置し、複合体沈殿物の有無を観察した。
- (5) 本試料とRCA₁₂₀との反応性を検討するため調整した試料 (250 μ g/ml) およびintactヒトIgG (250 μ g/ml) をニトロセルロース膜にドットプロットした後、プロッキングバッファーにてプロッキングし、RCA₁₂₀-peroxidase (10 μ g/ml) を500 μ l加え、60分間反応させた。よく洗浄した後、peroxidase-基質溶液 (4-クロロナフトール) を加え発色させ、発色の有無を観察した。
- (6) 本試料とintactヒトIgG の各種レクチンとの反応性の比較を検討するために調整した試料 (250 μ g/ml) およびintactヒトIgG (250

- (1) 調整した試料 (10 μ g/ml) をLaemmli 系の SDS-PAGEにより5~20%のグラジェントゲルを用いて、純度および分子量を調べた。
- (2) 本発明試料が抗ヒトIgG 抗体との反応性が保持されているか否かを検討するために、調整した試料 (250 μ g/ml) の20 μ gをニトロセルロース膜にドットプロットし、乾燥後プロッキングバッファー (50mM Tris-HCl, 0.15MNaCl, 0.05% NP-40, 2.5% gelatin (w/v)) でプロッキングを60分間、室温にて行った。プロッキング終了後、マウス抗ヒトIgG-peroxidase (市販の溶液を500倍に希釈したもの) 500 μ lを加えて60分反応させ、プロッキングバッファーで洗浄した後、TBS (20mM Tris-HCl, 0.5MNaCl, pH7.4) でリス後、バーオキシダーゼの基質である4-クロロナフトール液を加え、発色を観察した。また、調整した試料を常法によりSDS-PAGE後ウエスタン・プロットし、抗ヒトIgG-peroxidaseと反応させた。

μ g/ml) をそれぞれ20 μ gずつドットプロットし、プロッキング後、Biotin-concanavalin A (Con A)、Biotin-Lens culinaris (LCA)、Biotin-Bandeiraea simplicifolia (BS II)、Biotin-phytolacca americana、Biotin-Lycopersicon esculentum、Biotin-Dolichos biflorus (20 μ g/ml) を500 μ l加え、60分間反応させ、プロッキングバッファーでリス後洗浄し、つづいてstreptavidin-peroxidase 500 μ lを加え、60分間反応させた。反応後、洗浄し、酵素基質液 (クロロナフトール500 μ g/ml) 3 μ lを加え、発色反応を開始させた。

実施例 3

実施例1で作られたAgalactosyl IgG を結合させたニトロセルロースを用い、リウマチ因子の検出を行った。即ち、固相化Agalactosyl IgG にプロッキングバッファーで50倍希釈したヒト血清1mlを加え、60分間室温で反応させ、リウマチ因子を選択的に結合させる。リス洗浄後、標識レクチン (RCA₁₂₀-peroxidase) を加え、

60分間 感させた。

洗浄後、酵素基質 (4-クロロナフトール: 500 μ g/ml, 3 ml) を加え、発色させた。その発色シグナルにより、リウマチ因子の検出および定量を行った。発色シグナルの定量化は、Dual-wavelength Flying-spot scanner CS-9000 (島津) を用い、波長540nmで行った。

結果

- (1) 調整した試料をLaemmli系によるSDS-PAGEを行った結果、分子量約16万ダルタンに1本のバンドを認め、他の領域にはバンドは認められなかった。また、そのバンドの位置はintactヒトIgGの位置と一致していた(図1)。
- (2) 調整した試料をニトロセルロース膜にドットプロットし、抗ヒトIgG抗体-ペルオキシダーゼと反応させた結果、抗ヒトIgGと反応性を示し、抗原性は失われていないことが示された。また、試料をウエスタンプロットし、抗ヒトIgG抗体-peroxidaseと反応させた結果、分子量16万のバンドが染色され、そのバ

これらの結果はインタクトヒトIgGのガラクトース残基を検出するのにはRCA₁₂₀が有効なプローブであること、また本発明試料は、RCA₁₂₀とはまったく反応しないことからガラクトースを含まないヒトIgGであることを示す。

- (6) 調整した試料およびintactヒトIgGをそれぞれドットプロットし、各種レクチンとの反応性の違いを検討したところ、Con A、LCA、BS IIがintactヒトIgGと比べて本試料とよく反応することがわかった(表2)。

表 1 本発明試料のRCA₁₂₀との反応性

	RCA ₁₂₀ との反応性の有無 (+, -)
本発明試料 ヒト(Agalactosyl-IgG)	-
ヒトIgG	+++

・本発明試料をRCA₁₂₀と反応させると、全く反応しない。一方、intactヒトIgGはRCA₁₂₀に強く反応する。

ンドの領域はヒトIntact IgGと同一の位置であり、IgGであることが示された(図2)。

- (3) 調整した試料をオクタロニー免疫二重拡散法により抗ヒトIgGとの反応性を調べたところ、抗ヒトIgG抗体と反応し、一本の沈降ラインが認められた。
- (4) 調整した試料とプロテインAとの反応性を調べたところ、試料とプロテインAは反応し、反応してできた複合体が沈殿となって観察された。

以上の結果は本試料が各種酵素処理によりタンパク質部分は分解されておらず、Intact IgGと同様の諸性質、即ち分子量16万ダルタン(非還元)、抗ヒトIgG抗体と反応することと、プロテインAと反応することなどが示された。

- (5) 調整した試料をドットプロットし、RCA₁₂₀-peroxidaseで反応させた結果、全く反応しなかった。一方、intactヒトIgGはRCA₁₂₀-peroxidaseに強い反応性を示した(表1)。

表 2 本発明試料とintactヒトIgGとの各種レクチンとの反応性の比較

使用したLectin	本発明AgalactosylIgG	intactヒトIgG
① ConA	+++	+
② Phytolacca	±	-
③ Lycopersicon	-	-
④ Dolichos	±	-
⑤ BS-II	+	-
⑥ PHA-B ₄	+++	+++
⑦ LCA	+++	+
⑧ WGA	-	-
⑨ PNA	-	±

略語説明およびfullname

- ① ConA: concanavalin A
- ② Phytolacca americana
- ③ Lycopersicon esculentum
- ④ Dolichos biflorus
- ⑤ BS-II: Bandeiraea simplicifolia
- ⑥ PHA-B₄: phaseolus vulgaris

⑦ LCA; *Lens culinaris*
 ⑧ A; *Triticum vulgaris*
 ⑨ PNA; *Arachis hypogaea*

Agalactosyl IgG と intact IgG の各種レクチンとの反応性を調べた。intact IgG とはほとんど反応しないかわずかしか反応しないレクチンの中で ConA, LCA が Agalactosyl IgG とは強く反応するようになる。また、PHA-E は、Agalactosyl IgG と intact IgG の両者に強く反応する（反応の場合は +, - で表示し、+ は陽性、- は陰性を示す）。

【発明の効果】

実験例

1. 試料

慢性関節リウマチ患者および健常人血清を調整し、実験に使用した。

方法

Agalactosyl IgG (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をリン酸バッファー (50mM リン酸塩, 0.15M NaCl, pH 7.4) に溶解し、その 20 μl をニトロセルロース

膜にドットプロットし、乾燥後、プロッキングバッファー [50mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.05% NP-40, 2.5% ゼラチン (W/V), pH 7.4] でプロッキングを行い、リウマチ因子の検出および定量に用いた。

RA患者および健常人血清をプロッキングバッファーで希釈後、上記 Agalactosyl IgG をプロットしたニトロセルロース膜に加え、60分間室温にて反応させリウマチ因子を選択的に結合させる。反応後、プロッキングバッファーで軽くリーンスし、5分間の洗浄を2回繰り返した後、RCA₁₂₀-Peroxidase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 500 μl 加え、60分間、室温で反応させる。反応後、上記と同様の方法でリーンス、洗浄を繰り返した後、TBS (20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.4) でリーンスした後、ペルオキシダーゼの基質溶液 (4-クロロナフトール; 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、発色反応を開始する (5~10分)、反応終了後、蒸留水でよく洗浄した後、乾燥し、ニトロセルロース膜上の発色シ

グナルを定量化した。定量化は Dual-wavelength Flying-spot scanner CS-9000 (島津) ($\lambda = 540\text{nm}$) によって行われた。

結果

リウマチ患者 7 例、健常人 6 例の血清を用いてリウマチ因子の検出、定量を行った結果、平均カウント数が健常人で (8403)、リウマチ患者で (31108) の結果が得られ、RA患者グループで高値を示すことが判明した (図 3)。

4. 図面の簡単な説明

図 1 は本発明試料及びヒト IgG について SDS-PAGE 後、クーマクーブル染色によりバンドの検出を行った結果を示す図である。なお、試料はどちらも還元処理はしていない。

図中、1 のレーンは本発明試料 (ヒト IgG をシリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ処理して得た Agalactosyl IgG) を、2 のレーンはヒト IgG (酵素未処理) を示す。

図 2 は試料をウエスタンプロットし、マウス抗ヒト IgG 抗体-peroxidase で処理した後、発

色させバンドの検出を行った結果を示す図である。なお、発色は 4-クロロナフトールを用いた。

図中、1 のレーンは本発明試料 (ヒト IgG をシリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ処理して得た Agalactosyl IgG) を、2 のレーンはヒト IgG (酵素未処理) を示す。

図 3 は RA 患者及び健常人血清中のリウマチ因子を RCA₁₂₀ でステイニング後、それぞれのカウント数を比較したグラフである。

出願人代理人 古谷 勝

■ 1

■ 3

